



TITLE:

# Prediction of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein on the Basis of Statistical Thermodynamics( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Kajiware, Yuta

---

CITATION:

Kajiware, Yuta. Prediction of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein on the Basis of Statistical Thermodynamics. 京都大学, 2018, 博士(エネルギー科学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21193>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-06-24に公開; 許諾条件により要旨は2018-06-24に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	梶原佑太
論文題目	Prediction of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein on the Basis of Statistical Thermodynamics (膜蛋白質の熱安定性を向上させるアミノ酸置換の統計熱力学に基づく予測)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、熱およびその他の要因に対して膜蛋白質の立体構造安定性を向上させるアミノ酸置換を経験則に頼らず統計熱力学に基づいてどこまで予測できるかを論じた結果をまとめたもので、6章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、膜蛋白質の中でも特に重要なG蛋白質共役型受容体(GPCR)を対象とし、その構造安定性が主として膜内部位のそれに支配されることを論じ、安定性を記述するための必要最低限の物理因子について考察した。膜蛋白質の溶媒として作用する炭化水素基集団の並進移動に起因するエントロピー効果が全く考慮されていないことが従来法の最大の問題点であると指摘した。この効果は、積分方程式論と形態計測学的アプローチの統合型を用いて効率的に取り込むことができることを示した。構造形成に伴って蛋白質内静電相互作用エネルギーが大きく低下するが、その主要成分は分子内水素結合形成に伴うエネルギー低下であることを論じた。</p> <p>第2章では、第1章で述べた概念に基づいてGPCR用の自由エネルギー関数<math>F</math>を開発し、それを野生体の構造が既知である場合に適用した。構造形成に伴う<math>F</math>の変化(負の量)を<math>\Delta F</math>とすると、<math> \Delta F </math>が大きいほどその構造はより安定となる。以下では、相対的に大きく安定化すると予測された置換を実験で調べて当たる確率を的中率と呼ぶ。GPCRの1つであるアデノシンA<sub>2a</sub>受容体(A<sub>2a</sub>R)の不活性型を対象とし、置換体の構造はモデラーを用いてモデル化したところ、的中率は6/7であった。通常のアラニン置換よりも安定性が大きく向上する単置換を複数通り確認できた。</p> <p>第3章では、「野生型A<sub>2a</sub>Rとその8置換(7個のアラニン置換とアラニンからロイシンへの置換)体の構造が分かっており、かつ、後者の方の熱変性温度が約20℃も高い」という実験事実に注目した。第2章で開発した<math>\Delta F</math>を用いて8置換体の方が遥かに安定であることを示した。さらに、そのより高い安定性は、構造形成に伴う炭化水素基集団のエントロピー利得の増大と分子内水素結合形成によるエネルギー低下の強化の両方によってもたらされていることも分かった。</p> <p>第4章では、野生体の構造が未知である実践的な場合とどのように取り組むかを検討した。A<sub>2a</sub>R野生体の構造が未知であると仮定し、アミノ酸配列の相同性が高くかつ構造が分かっているものを鋳型として、ホモロジーモデリングを用いて野生体の構造をモデル化した。モデル構造の評価指標として結晶構造とのRMSDが通常用いられるが、RMSDは結晶構造が未知の場合には計算できない。そこで、多くのモデル構造候補の中から<math>\Delta F</math>が最低となるものを選び、置換体の構造はモデラーを用いてモデル化し、安定化置換体を予測してみた。的中率は5/7にしか落ちなかった。</p> <p>第5章では、GPCRファミリーの約8割を占めるClass Aの不活性型に対し、鍵残基とホットスポットの存在を発見した。鍵残基とは、「それを置換して得られる変異体の多くが大き</p>			

く耐熱化する」残基であり、各 GPCR に複数個存在する。数多くの GPCR に保存され共通に鍵残基となる残基がホットスポットである。位置の目安として知られる BW 数が 3.39 である残基がホットスポットであることを示した。特に、それをアルギニンまたはリジンに置換することによって顕著な耐熱化が実現できることを予測し、実際にプロスタグランジン E2 タイプ 4 受容体とアセチルコリン M2 受容体の耐熱化に成功し、それらの立体構造を新たに決定できた。BW 数 3.39 の残基がホットスポットにならない例も複数見つかっており、その場合は本研究で構築した方法論を用いて個別に熱安定化置換を予測する必要がある。

第 6 章は結言である。従来の膜蛋白質の研究で見過ごされてきた炭化水素基集団の並進移動に起因するエントロピー効果を新機軸とし、可能なあらゆるアミノ酸置換を高速で吟味できる方法論を構築し、GPCR の Class A の不活性型に対してその有効性を実証した。*F* は他の Class の GPCR および GPCR の活性型にもそのまま適用できるはずであり、GPCR 以外の膜蛋白質にも拡張できるものと考えられる。膜蛋白質は、情報伝達・物質輸送・エネルギー変換など、細胞の機能発現に不可欠な種々の役割を担う。本研究をさらに発展させることにより、多種類の膜蛋白質の耐熱化変異体を大量に調製・生産することが可能となり、精製標品を用いた構造・機能解析や薬剤探索が飛躍的に進展するものと期待される。得られた構造・機能情報は多くの波及効果をもたらし、関連する生命機能や疾病原因の理解、様々な病気の治療薬の開発などに至る我が国のライフサイエンスの推進に大きく貢献できるものと考えられる。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、熱およびその他の要因に対して膜蛋白質の立体構造安定性を向上させるアミノ酸置換を経験則に頼らず統計熱力学に基づいて予測する新たな方法論を研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 膜蛋白質用自由エネルギー関数  $\Delta F$  を構築し、それを用いて構造安定化に繋がる置換を予測する方法論を開発すると共に、Class A の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の不活性型に対してその有効性を実証した。 $\Delta F$  は以下の特徴を有する：リン脂質分子の非極性鎖を構成する炭化水素基集団が膜蛋白質の「溶媒」として機能し、主としてその並進配置エントロピー効果が構造安定性に重要な役割を果たすという新概念を導入している；このエントロピー効果を積分方程式論と形態計測学的アプローチを統合することによって計算した結果、考え得るあらゆる置換をほどこした膜蛋白質の構造安定性を高速で評価できる。
2. 野生体の構造が既知であるアデノシン  $A_{2a}$  受容体 ( $A_{2a}R$ ) を対象とした場合、比較的大きく安定化すると予測された置換を実験で調べている中する確率 (的中率) は 6/7 に達した。
3. 野生体の構造が未知である実践的な場合と取り組むため、 $A_{2a}R$  野生体の構造を使用せず、アミノ酸配列の相同性が高くかつ構造が分かっているものを鋳型として、ホモロジーモデリングを用いて野生体の構造をモデル化した。多くの候補モデルの中から  $\Delta F$  が最低となるものを選び、安定化置換体を予測したところ、的中率は 5/7 にしか落ちなかった。
4. 鍵残基とホットスポット (HP) の存在を発見した。鍵残基とは、「それを置換して得られる変異体の多くが大きく安定化する」残基であり、各 GPCR に複数個存在する。数多くの GPCR に保存され共通に鍵残基となるものが HP である。Class A の GPCR の不活性型に対しては、位置の目安として知られる BW 数が 3.39 である残基が HP の 1 つであり、それをアルギニンまたはリジンに置換することによって顕著な安定化に繋がることを予測した。実際にプロスタグランジン E2 タイプ 4 受容体とアセチルコリン M2 受容体の安定化に成功し、それらの立体構造を新たに決定できた。

以上の結果は、情報伝達・物質輸送・エネルギー変換など、細胞の機能発現に不可欠な種々の役割を担う膜蛋白質の大量調製、精製標品を用いた構造・機能解析、さらには薬剤探索の進展に大きく寄与するものと期待される。よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年2月21日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：2018年6月24日以降